

甘蔗幼叶切段培养中的体细胞胚胎发生

李春瑶 李军生 梁倩华 杨继华

(广西师范大学生物系, 桂林)

摘要 本文从形态学和组织学方面研究了甘蔗幼叶胚性愈伤组织发生及体细胞胚胎的形成过程。甘蔗幼叶片切段培养于含2.4-D $1.5\text{mg}/\text{l}$ 的MS培养基上, 4—6天后切段开始形成愈伤组织, 约10天后愈伤组织表面出现白色颗粒状结构。将含有白色颗粒状结构的愈伤组织转移至不含激素的培养基中, 7—10天后可见有小植株长出。组织学和形态学观察表明, 甘蔗离体再生植株是通过体细胞胚胎发生途径。

关键词 甘蔗; 体细胞胚胎发生

甘蔗是重要的禾本科植物, 全世界每年的食糖有65%来源于甘蔗。目前甘蔗组培技术已被广泛地应用于研究甘蔗生理、甘蔗无性快速繁殖、甘蔗突变体育种及病毒去除等方面^[1, 11, 12, 14, 15, 17]。关于甘蔗离体再生的成苗途径, 目前有多种看法, 有的研究者们认为通过不定芽途径即愈伤组织分化芽途径^[2, 10, 11, 17]; 有的认为通过体细胞胚胎发生途径^[4, 18, 21]; 有的则认为两条途径都存在^[5]。大多数这些结论的得出, 都缺乏详尽的形态科学及组织学证据。本实验以广西培育出的甘蔗良种桂糖11号为材料, 从组织学及形态学方面详细研究甘蔗离体培养中愈伤组织发生和体细胞胚的形成过程。

材 料 和 方 法

材料 本实验中采用的材料是广西培育的良种桂糖11号。蔗种由柳城县甘蔗研究中心提供, 栽种于网室。实验时, 取成长蔗(高约2米)蔗尾, 用70%酒精消毒外表后, 剥去外层老叶, 无菌条件下取-1及-2叶叶片, 用解剖刀将幼嫩部分切成2mm长的切段, 分别放在含有一定激素浓度的培养基中培养, 每个150mm³三角瓶放10个切段。

培养基 基本培养基为MS, 附加蔗糖3%, 琼脂0.8%, PH5.8, 附加不同浓度的2.4-D构成各种培养基。培养基在 $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$ 下灭菌20分钟。

培养条件 愈伤组织诱导及继代培养在黑暗进行, 胚状体分化及成苗则在光下(约1500 Lux), 培养温度25℃, 相对湿度60—80%。

组织学方法 在外植体培养的不同时期(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20天)及愈伤组织分化的不同阶段(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14天)取培养材料固定于FAA固定液中, 固定好的材料经一系列不同浓度梯度的乙醇脱水, 然后按常规石蜡切片法制片, 切片厚度10—12 μ , 代氏苏木精染色。制好的片在奥林匹斯显微镜下观察并摄影。

结 果

一、甘蔗叶片切段脱分化和愈伤组织形成过程

将幼嫩的叶片切段(2mm长)置于含2,4-D $1.5\text{mg}/\text{l}$ 的MS培养基中,一天后,即可见叶片切段吸水膨胀、伸长,三天后切段几乎伸长 $\frac{1}{2}$ 倍。第四天,用放大镜可观察到两端切口出现突起,第六天用肉眼即可看到在两端切口靠背表面的地方有淡黄色的愈伤组织形成,而在叶片的上表面很少或没有愈伤组织形成。这些淡黄色的愈伤组织随培养时间的延长而逐渐增多。在切口部位长出的愈伤组织渐渐由两切口向背面表皮漫延,最后从叶片的背表面包围了整个切段。从叶片上刚产生出来的愈伤组织多为淡黄色,培养10天后,在这些淡黄色的愈伤组织中开始出现白色致密的颗粒结构状,这些白色颗粒状结构增殖很快,如果将含有这些颗粒状结构的愈伤组织转移到不含激素的培养基中,则约7—10天后可见小植株长出。

通过组织学方法可把生产出来的愈伤组织分为胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织两类。胚性愈伤组织较硬,结构紧密、表面光滑、轮廓清楚,主要由细胞小、细胞质浓厚、核大而染色深的细胞组成,细胞间排列紧密。胚性愈伤组织细胞极易分化出胚状体,因而在这类愈伤组织上可看到许多大小不同的白色颗粒状结构(图版I:1)。另一类愈伤组织淡褐色,结构松软、轮廓不清楚,它由细胞较大、液泡化、核相对较小且排列松散的细胞组成(图版I:2),这类愈伤组织偶尔能分化出根。

叶片在含有2,4-D $1.5\text{mg}/\text{l}$ 的MS培养基上,主要产生胚性愈伤组织,其占总愈伤组织的80%以上,因而在分化培养基上能分化出大量胚状体,继而发育成完整植株。

从组织切片上可以看出,培养初期由于细胞吸水,使得叶片背表面正对着小维管束的部位产生突起。培养2天后,即可见两突起间的表皮细胞及两小维管束间薄壁细胞恢复分裂机能(图版I:3),细胞分裂逐渐形成一个分生中心,由这一分生中心继续分裂导致愈伤组织形成(图版I:4)。通过这种方式产生的愈伤组织具有胚胎发生的能力。

叶片还有一种形成愈伤组织的方式,这种方式的细胞分裂首先见于小维管束上方细胞突起的表皮下细胞(图版I:5),这些细胞分裂产生分裂中心,突破表皮而形成而可见的愈伤组织(图版I:6)。目前还不能断定由这种方式形成的组织是否非胚性,但见愈伤组织表面细胞排列很松散。

二、叶片切段培养中的体细胞胚胎发生

叶片切段培养约10天后,在产生的胚性愈伤组织表面即出现一些细胞质丰富、细胞核较大的细胞(图版I:7)。这些细胞具有胚胎发生能力,在含有2,4-D培养基上,这些胚性细胞分裂形成2、4、8及多细胞的结构(图版I:8;II:9,10),并进一步发育为球形胚(图版II:11)。这些球形期胚状体如果转移到不含激素的培养基中,则很容易发育为成熟胚并萌发成完整植株。组织学观察证实,这些球形胚的进一步发育与禾本科植物合子胚的胚胎发育过程极为相似。它首先在球形胚的一侧进行细胞分裂形,成一个小突起(图版II:12),随后在这个突起部位分化出胚根及胚芽原基(图版II:13),并进一步发育为成熟胚(图版II:14—15)。成熟的胚状体具有禾本科植物合子胚所具有的典型特征,即盾片、胚芽鞘、胚芽、胚根和胚根鞘。胚状体与母体愈伤组织无维管联系,只是通过由数个或数层细胞构成的胚柄状结构与愈

伤组织相连。成熟的胚状体在不含2,4-D的培养基中可萌发成完整植株(图版Ⅱ:16)。

讨 论

1. 关于甘蔗组织培养过程中的成苗途径

目前,关于甘蔗组织培养过程中植株再生途径的观点很多,但许多这些观点的得出都缺乏详尽的组织学证据^[21]。Ho and Vasil^[21]通过对甘蔗离体再生途径及一系列禾本科植物离体再生途径的研究后指出,甘蔗离体再生植株可能都是通过体细胞胚胎发生途径而非其它途径。

Haccius认为,判断体细胞胚的重要特征是它具有两极性,在胚状体发育早期即在方向相反的两极有苗端和根端的分化;在胚状体的发育过程中,它的维管组织与愈伤组织无联系(引自张丕方^[7])。从本实验中形成的胚状体来看,完全符合Haccius判断胚状体的条件,产生的胚状体也与禾本科植物合子胚⁶的一样,具有单片的盾片及胚芽鞘、胚芽、胚根及胚根鞘等结构。胚状体上胚芽鞘出现在叶片出现之前,这与Ahloowalia^[8]区分甘蔗不定芽发生和胚状体发生的观点是一致的。本实验的组织学观察还发现胚状体的发育过程与禾本科植物合子胚的胚胎发育过程类似,因而认为,在本实验条件下,甘蔗幼叶片离体再生植株是通过体细胞胚胎发生途径。

2. 体细胞胚胎的起源

关于禾本科植物离体胚胎发生的起源问题,目前有两种观点,一是认为通过多细胞起源,胚状体直接由一团胚性愈伤组织分化而来^[13,23]。更多的研究者认为体细胞胚来源于核大、细胞质浓厚、细胞壁厚的胚性细胞^[9,10,18-22]。从本实验结果看出,甘蔗体细胞胚是从单细胞发生的,由胚性单细胞经过类似合子胚胚胎发育途径发育成成熟的胚状体,而不是通过多细胞起源。

参 考 文 献

- (1) 轻工业部甘蔗糖业研究所等,1985:甘蔗栽培学,133—141页,农业科学出版社。
- (2) 叶树茂等,1979:植物生理学通讯,1979(3):13—16。
- (3) 韩光禧等,1983:广西农学院学报,(3):83—94。
- (4) 曾吉恕,1979:植物生理学报,5(4):411—416。
- (5) 梁倩华等,1984:植物生理学通讯,(2):29—32。
- (6) 李杨汉,1979:禾本科作物的形态与解剖,488页,上海科技出版社。
- (7) 张丕方等,1982:植物学报,24(3):282—284。
- (8) Ahloowalia, B. S. et al, 1983: Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. Plant Cell Report 2: 21—25.
- (9) Botti, C. et al, 1982: Can. J. Bot. 62: 1629—1635.
- (10) Heinz, D. J. and Mee, G.W.P. 1969: Crop Sci. 9: 346—348.
- (11) Heinz, D.J. et al, 1977: In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture (Reinert, et al eds) 3—17. New York.
- (12) Liu, M.C. 1981: In: Plant tissue cultuer—Methods and applications in agricul-

- ture. (T.A. Thorpe ed) 299—324. Academic Press.
- [13] McCain, J.W. 1986 : Bot. Gaz. 147 (4) : 453—460.
- [14] Mori, K. 1971 : JARQ. 6 : 1—7.
- [15] Nadar, H.M. et al, 1977 : Crop Sci. 17 : 814—816.
- [16] Nadar, H.M. et al, 1978 : Crop Sci. 18 : 210—216.
- [17] Nickell, L.G. 1967 : Proc. ISSCT 12 : 887—892.
- [18] Vasil, V. et al, 1981 : Amer. J. Bot. 68 (6) : 864—872.
- [19] Vasil, V. et al, 1982 : Amer. J. Bot. 69 (9) : 1441—1449.
- [20] Wang, D.Y. et al, 1982 : Plant Sci. Lett. 25 : 147—154.
- [21] Wai-Jane Ho, Vasil, I.K. 1983 : Protoplasma. 118 : 169—180.
- [22] Wai-Jane Ho, Vasil, I.K. 1983 : Ann. Bot. 51 : 719—726.
- [23] Wernicke, 1982 : protoplasmazoo 111 : 53—62.

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM LEAF TISSUES OF SUGARCANE

Li, Chun Yao; Li, Jun Sheng; Liang, Qian Hua and Yang, Ji Hua
(Department of Biology, Guangxi Normal Univenstiy)

Abstract The formation of embryogenic callus and somatic embryogenesis from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) leaves were investigated. When cultured on medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1.5/1, sucrose 3%, segments of young leaves began to produce callus after 4—6 days in culture, and the amount of callus increased with the culture time. In about 10 days some white, compact nodular structures appeared on the surface of the callus. Histological studies showed that the white compact nodular structures were embryoids which appeared in the early developing stage. Transferred of the callus containing nodular structures to MS medium devoiding of plant hormones, perfect embryoids were formed which developed later into plantlets. It was suggested that the plants regenerated from the callus via somatic embryogenesis.

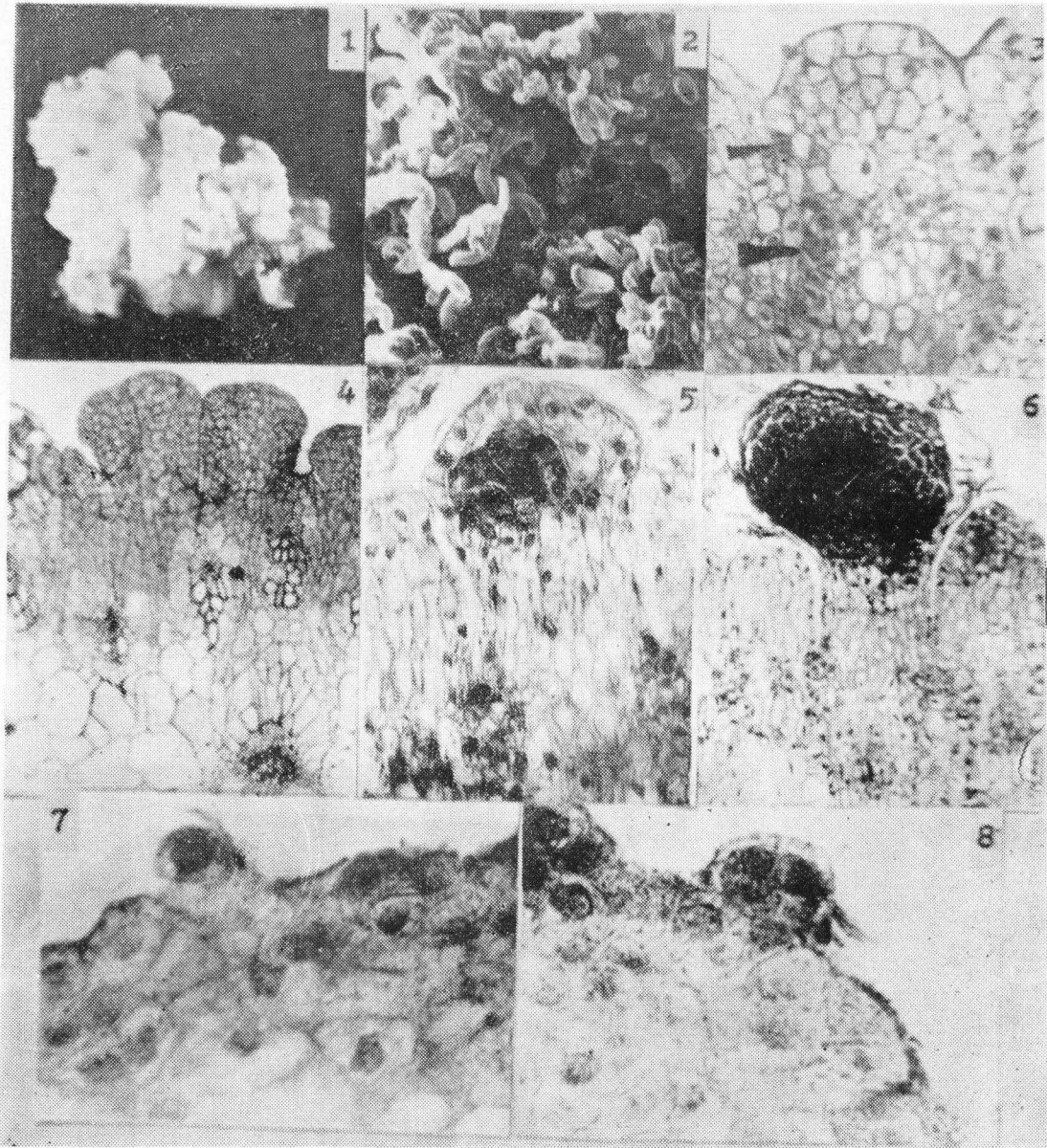
Key words sugarcane; somatic embryogenesis

李春瑶等：甘蔗幼叶切段培养中的体细胞胚胎发生

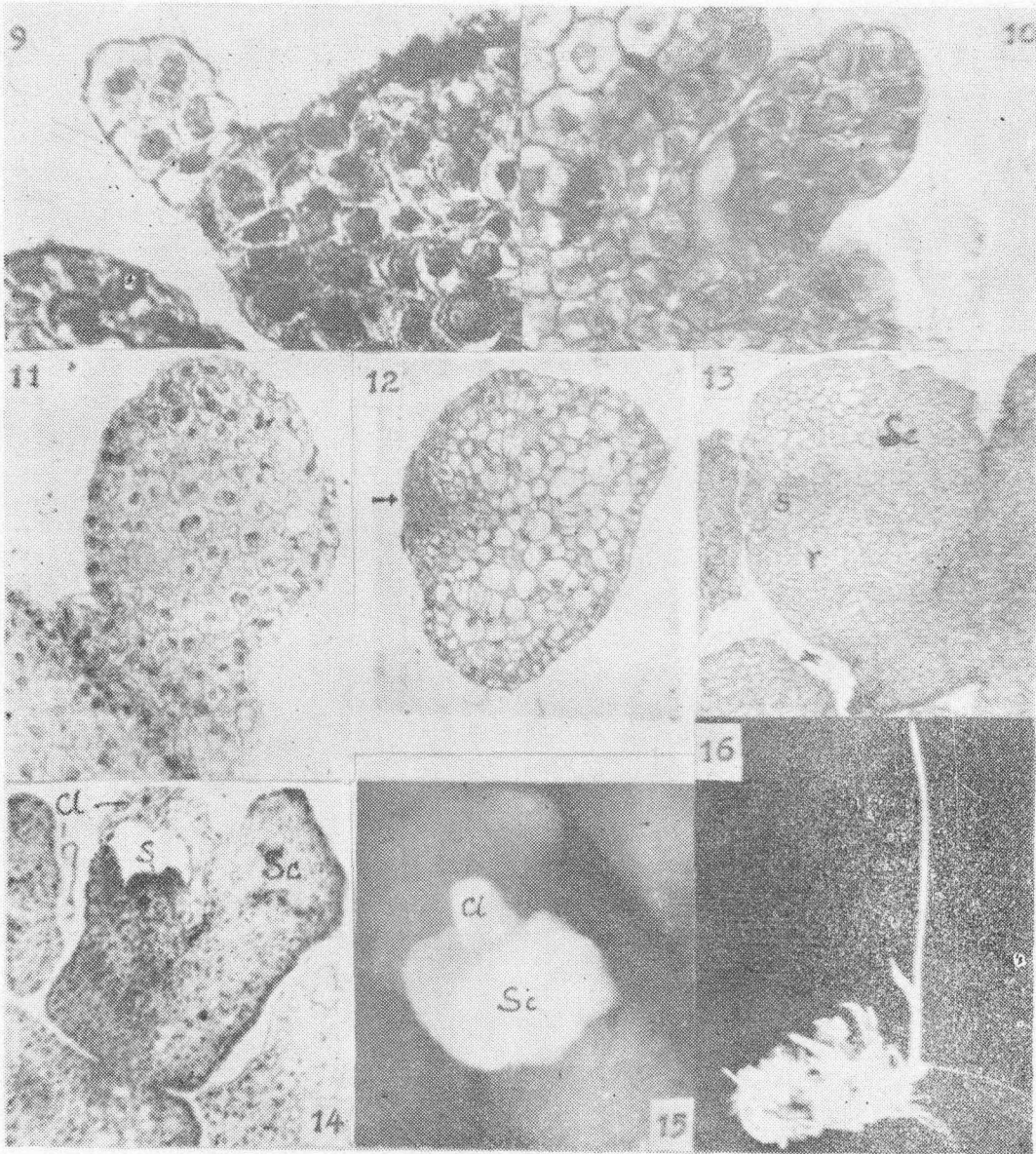
Li, Chun Yao et al. : Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of sugarcane

图版 I

plate I



1. 培养12天的叶片切段上长出胚性愈伤组织, $\times 10$; 2. 非胚性愈伤组织表面扫描, 示外表为长形的液泡化细胞, $\times 150$; 3. 培养2天的叶片横切, 示细胞分裂启动, $\times 200$; 4. 培养7天叶片, 示愈伤组织从两小维管束间长出, $\times 120$; 5. 培养10天叶片, 示维管束上方细胞突起的表皮下细胞恢复分裂, $\times 150$; 6. 培养15天叶片, 示愈伤组织形成; 8—15, 示体细胞胚胎发生过程: 7. 愈伤组织表面出现胚性细胞, $\times 350$; 8. 四细胞原胚细胞形成, $\times 350$;



9—10. 多细胞原胚, $\times 250$; 11. 球形胚, $\times 100$; 12. 在球形胚的一侧进行细胞分裂, $\times 80$; 13.. 胚根胚芽分化; 14—15. 成熟期胚状体: Sc—盾片, Cl—胚芽鞘, S—胚芽, r—胚根, $\times 50$; 16. 由胚状体萌发成为完整植株, $\times 0.8$.